

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Estudo do efeito do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio-579 em
modelos animais de esquizofrenia e memória e sobre fatias
hipocampais agudas**

CAMILA BOQUE ANTONIO

PORTO ALEGRE, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Estudo do efeito do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio-579 em
modelos animais de esquizofrenia e memória e sobre fatias
hipocampais agudas**

Dissertação apresentada por Camila
Boque Antonio para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates

PORTO ALEGRE, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2011 pela Banca Examinadora contituída por:

Dr. Francois Germain Noel

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dr. Cristiane Matté

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Dr. Rafael Roesler

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Boque Antonio, Camila
Estudo do efeito do derivado N-fenilpiperazínico
LASSBio-579 em modelos animais de esquizofrenia e
memória e sobre fatias hipocampais agudas / Camila
Boque Antonio. -- 2011.
98 f.

Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Esquizofrenia. 2. LASSBio-579. 3.
Antipsicóticos. 4. Glutamato. 5. S100B. I. Kuze
Rates, Stela Maris, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Stela pelo apoio pessoal e profissional, ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e pelo exemplo profissional;

À Andresa, Gilda, Andressa, Eveline, Liz, Milene, Diego Alice, Luisa, Fernanda e Ana por serem não apenas colegas de laboratório, mas amigos maravilhosos sempre dispostos a ajudar;

À Andresa, Milene e Diego por contribuírem diretamente com a realização deste trabalho, pela amizade e apoio constante;

Ao professor Dr. Carlos Alberto Gonçalves do laboratório de Plasticidade Neuroglial da Bioquímica pela colaboração e receptividade em seu laboratório;

Ao grupo do professor Dr. Carlos Alberto Gonçalves, em especial a Paula Lunardi, pelos ensinamentos, disponibilidade e contribuição neste trabalho;

Aos meus pais Valdir e Odete, exemplos da minha vida, pelo amor, carinho, pelo apoio em todas as decisões, me motivando e incentivando a alcançar meus objetivos profissionais e pessoais;

Aos meus irmãos Vitor e Lucas pelo apoio, alegria, amor e por sempre estarem ao meu lado;

Ao meu namorado Plínio pelo amor e compreensão, que me motivaram diariamente a alcançar meus sonhos.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia/UFRGS, no âmbito do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - PROCAD – CAPES (processo 420.015/2005-1), numa parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFRGS e o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal/UFRJ. É apoiado pelo INCT de Fármacos e Medicamentos – INCT-INO FAR – CNPq e representa a continuidade de um grande projeto, iniciado em 1999, que contempla o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novas substâncias protótipo, candidatas a fármacos neuroativos. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

RESUMO

Este trabalho apresenta a continuidade da avaliação farmacológica do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio-579 em busca de um novo candidato a antipsicótico de segunda geração. Em estudos anteriores, demonstramos que LASSBio-579 base livre é um potencial candidato a antipsicótico atípico capaz de modular três diferentes sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia: a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica; entretanto, LASSBio-579 na forma de cloridrato apresenta baixa biodisponibilidade. Neste trabalho avaliamos inicialmente a ação de LASSBio-579.HCl.β-ciclodextrina, proposto como alternativa para melhorar a biodisponibilidade. Porém, quando avaliado no modelo de escalada induzida por apomorfina, preditivo de atividade antipsicótica, essa preparação não foi efetiva. Assim, seguimos a avaliação farmacodinâmica com LASSBio-579 base livre, utilizando modelos preditivos de atividade antipsicótica, em camundongos. Neste trabalho foram realizados ainda ensaios *in vitro*, onde se avaliou a ação de LASSBio-579 sobre a viabilidade celular, captação de glutamato e secreção de proteína S100B, utilizando-se para isso fatias hipocâmpais de ratos tratadas de forma aguda com LASSBio-579 nas concentrações de 0,1; 1,0; 10 e 20μM.

Palavras-chave: antipsicóticos, esquizofrenia, LASSBio-579, glutamato, S100B.

ABSTRACT

This study presents the continuity of the pharmacological evaluation of the *N*-phenilpiperazine derivative LASSBio-579, searching a new second generation antipsychotic compound. In previous studies we have demonstrated that LASSBio-579 in form of base is a potential atypical antipsychotic able to modulate three different neurotransmitter systems involved in the pathophysiology of schizophrenia: dopaminergic, glutamatergic and serotonergic. However, LASSBio-579 hydrochloride has low bioavailability. In this study we evaluated LASSBio-579.HCl.β-cyclodextrin, prepared with the aim of increasing oral bioavailability, in the apomorphine induced climbing in mice, which is a model predictive of antipsychotic activity; and it was not effective. Thus, we continue the study with LASSBio-579 in form of base by testing it in others mice models predictive of antipsychotic activity. In this study, also were made *in vitro* studies performed in hippocampal acute slices which demonstrated that LASSBio-579 induced a glutamate uptake inhibition and also inhibited the S100B protein secretion.

Key words: antipsychotics, schizophrenia, LASSBio-579, glutamate, S100B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do derivado <i>N</i> -fenilpiperazínico LASSBio-579.....	3
Figura 2: Circuito básico das vias neuroquímicas envolvidas na esquizofrenia.....	12
Figura 3: Avaliação de LASSBio.579.HCl e LASSBio.579.HCl.β-ciclodextrina no modelo preditivo de atividade antipsicótica - escalada induzida por apomorfina.....	23
Figura 4: Avaliação de LASSBio-579 no modelo de hiperlocomoção induzida por antagonista NMDAR.....	24
Figura 5: Efeito de LASSBio-579 sobre a viabilidade e integridade de fatias hipocâmpais de ratos.....	25
Figura 6: Efeito de LASSBio-579 sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais de ratos.....	26
Figura 7: Efeito de LASSBio-579 sobre a secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivos Gerais	6
2.2. Objetivos Específicos	6
3. REVISÃO	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Testes in vivo	16
4.1.1. Animais.....	16
4.1.2. Tratamentos.....	16
4.1.3. Bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina.....	17
4.1.4. Hiperlocomoção induzida por antagonista NMDAR.....	18
4.2. Testes in vitro	19
4.2.1. Animais.....	19
4.2.2. Preparação e incubação de fatias hipocampais.....	19
4.2.3. Avaliação da integridade celular e viabilidade celular.....	20
4.2.4. Captação de glutamato.....	20
4.2.5. Medida de S100B.....	21
4.3. Ética	21
4.4. Análise Estatística	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Testes in vivo	23
5.1.1. Bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina.....	24
5.1.2. Hiperlocomoção induzida por antagonista NMDAR.....	24
5.2. Testes in vitro	25
5.2.1. Avaliação da integridade celular e viabilidade celular.....	25
5.2.2. Captação de glutamato.....	26
5.2.3. Medida de S100B.....	27
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	39
8. ANEXOS	49

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma desordem complexa e heterogênea com múltiplos domínios de sintomas: positivos (alucinações, agitação motora, delírios), negativos (embotamento afetivo, anedonia, isolamento social) e cognitivos (*déficit* de atenção, problemas de memória, fluência verbal comprometida) (van Os & Kapur, 2009). Os fármacos disponíveis aliviam os sintomas positivos e negativos, mas falham na habilidade de melhorar sintomas cognitivos, o que reduz seriamente a qualidade de vida dos pacientes (Abbot, 2010).

Uma iniciativa de larga escala fundada pelo *National Institute of Mental Health* conduziu um ensaio de efetividade conhecido como CATIE onde quatro antipsicóticos de segunda geração (clozapina, risperidona, quetiapina e olanzapina) foram comparados a um antipsicótico de primeira geração (perfenazina), em uma série de ensaios clínicos em pacientes esquizofrênicos. Os resultados geraram uma conclusão inesperada e controversa onde não houve diferença significativa na efetividade entre as duas classes de antipsicóticos. Somente a clozapina e, em alguns casos, a olanzapina demonstraram uma aparente melhor eficácia em pacientes não responsivos. Não houve diferença de ordem neurocognitiva ou psicossocial em relação aos fármacos descritos e, em geral, o estudo aponta uma similaridade nas propriedades destes antipsicóticos (Carpenter & Buchanan, 2008).

Considerando que antipsicóticos mais efetivos e seguros continuam sendo necessários, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de novos antipsicóticos. Primeiramente, nosso grupo descreveu a síntese de derivados *N*-fenilpiperazínicos, LASSBio-579, LASSBio580 e LASSBio581 (Menegatti *et al.*, 2003). A arquitetura molecular dos novos derivados foi planejada pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, através da técnica de hibridação molecular entre o antipsicótico atípico clozapina, devido ao seu alto grau de restrição conformacional e interessante perfil farmacológico (alta afinidade por receptores D₄) (Graeff *et al.*, 1999) e o composto L-741, ligante seletivo de receptores dopaminérgicos D_{2-like} (Kulagowski *et al.*, 1996), de modo a manter os grupamentos farmacofóricos necessários para interação com o bioreceptor-alvo, os receptores dopaminérgicos D_{2-like}.

Entre eles, destacou-se LASSBio-579 (**Figura 1**), o qual apresentou um perfil farmacológico pré-clínico, em roedores, compatível com o esperado para um antipsicótico atípico. Neves e colaboradores (2003; 2008; 2010) verificaram que esse composto age em três diferentes sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia: a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica, conforme verificado em estudos de *binding* para receptores *D₂-like*, *D₄*, *5-HT_{1A}* e *5-HT_{2A}*, e estudos de eletrofisiologia para canais do tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato). Interessantemente, quando comparamos os perfis de setividade de LASSBio-579 com os antipsicóticos utilizados na terapia, LASSBio-579 demonstra um perfil de seletividade semelhante ao antipsicótico aripiprazol, um antipsicótico atual que tem demonstrado uma melhora em relação aos demais antipsicóticos sobre os sintomas cognitivos (Fleischhacker, 2005). Além disso, LASSBio-579 apresenta ação antidopaminérgica *in vivo*, demonstrada em três modelos animais preditivos de atividade antipsicótica (sintomas positivos): inibição da estereotipia anfetamínica, bloqueio de *climbing* induzido por apomorfina e hipotermia anfetamínica. Estes efeitos ocorreram em doses que não induzem catatonia, um comportamento análogo aos sintomas extrapiramidais, indesejável e decorrente do tratamento com antipsicóticos típicos. Também foi demonstrada *in vivo* uma ação antagonista de receptores *5-HT_{2A}* e agonista de *5-HT_{1A}* (Neves *et al.*, 2008).

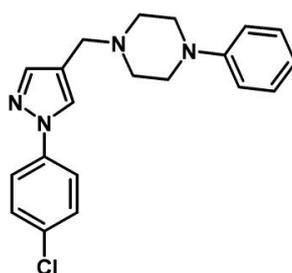


Figura 1: Estrutura química do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio-579.

O conjunto de resultados acima apresentado determinou o depósito de um pedido de proteção patentária junto ao Instituto Nacional de Proteção Industrial (INPI) intitulado “Novos Derivados *N*-fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos” (PI0303465-8), depositado em setembro de 2003 e renovado no ano seguinte (Uso de Derivados *N*-fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos PI0405418-5).

Sabendo-se que a indução de agranulocitose pela clozapina é a principal limitação para seu uso na clínica, parâmetros hematológicos foram avaliados para LASSBio-579 (30 mg/kg i.p.- 14 dias). Os valores de hematócrito, hemoglobina e contagem diferencial de leucócitos além da avaliação histológica da medula óssea não apresentaram diferença relevante em comparação aos animais tratados com salina. O peso corporal dos animais ao longo do tratamento não foi diferente entre os grupos e sinais de toxicidade não foram observados (Neves, 2003).

Adicionalmente, uma avaliação aguda da toxicidade de LASSBio-579 foi realizada através da determinação da dose letal 50 (DL₅₀). As alterações mais importantes observadas foram ptose palpebral e comportamento de imobilidade, sinais comumente associados a fármacos antidopaminérgicos. O valor de DL₅₀ obtido foi de 1405 ± 173mg/kg i.p.. De acordo com o Sistema de Classificação Global Harmonizado, LASSBio-579 seria classificado como categoria 4 (DL₅₀ entre 300 e 2000 mg/kg) (OECD, 2001). Comparando este valor com os dados existentes para haloperidol (DL₅₀ = 60 mg/kg em camundongos i.p.) e clozapina (DL₅₀ = 61mg/kg i.v. e 199 mg/kg v.o. em camundongos) (Budavari, 1996), podemos assumir que LASSBio-579 apresenta uma toxicidade aguda menor.

Entretanto, o perfil farmacocinético de LASSBio-579 demonstrou baixa biodisponibilidade oral e uma baixa penetração cerebral (Conrado, 2008), o que torna o mesmo pouco interessante para utilização clínica. Ao mesmo tempo, sua atividade sobre o sistema nervoso central poderia estar relacionada a uma distribuição específica em regiões cerebrais ou a atividade de metabólitos.

Os resultados obtidos até o momento caracterizam LASSBio-579 como um antipsicótico, com uma farmacologia pré-clínica preditiva de eficácia no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia e com um perfil vantajoso em relação aos efeitos adversos quando comparado com antipsicóticos de uso atual. Na continuidade deste projeto, este trabalho está voltado para investigação do efeito de LASSBio-579 em modelos animais de preditivos de atividade antipsicótica, bem como na avaliação de estratégias farmacêuticas que possam aumentar sua biodisponibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Aprofundar o estudo da atividade antipsicótica de LASSBio-579, através da avaliação de novas formulações, e em modelos animais preditivos de ação antipsicótica, bem como sobre parâmetros bioquímicos não aminérgicos relacionados à neurobiologia da doença.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a inclusão de LASSBio-579.HCl em β -ciclodextrina, como estratégia para aumento de biodisponibilidade, através do estudo do efeito no modelo de escalada induzida por apomorfina em camundongos;

Avaliar o efeito de LASSBio-579 em modelo preditivo de ação antipsicótica, em camundongos: hiperlocomoção induzida por cetamina;

Avaliar o efeito de LASSBio-579 sobre viabilidade celular, secreção de S100B e captação de glutamato, em modelo de tratamento agudo em fatias hipocâmpais de ratos.

A esquizofrenia tem sido descrita como “a pior doença que afeta a humanidade”, devido à multiplicidade de sintomas e a permanência dos mesmos ao longo da vida do paciente (Tandon *et al.*, 2008). O transtorno geralmente tem início com um episódio agudo, caracterizado por manifestações psicóticas positivas (sintomas positivos), como delírios, alucinações, fala e comportamento desorganizado e agitação motora (Wong e Van Tol, 2003). Com a progressão da doença tendem a surgir os sintomas negativos (embotamento afetivo, falta de iniciativa, isolamento social, pensamento estereotipado, anedonia) e cognitivos (falta de atenção e concentração, problemas de memória e aprendizagem, fluência verbal comprometida). Neste estágio, quando não tratados, os pacientes ficam cada vez mais deteriorados, podendo desenvolver um quadro de demência grave (Tandon *et al.*, 2008). Para uma revisão sobre a neurobiologia da esquizofrenia ver Keshavan e colaboradores (2008).

Apesar dos diversos estudos do último século, a etiologia e patofisiologia da esquizofrenia continuam relativamente obscuras. Este incompleto conhecimento sobre a natureza da esquizofrenia não pode ser atribuído a escassez de resultados. Na verdade, há milhares de publicações referentes à esquizofrenia que, entretanto, descrevem resultados discretos (Tandon *et al.*, 2008).

Quando Emil Kraepelin descreveu pela primeira vez o conceito de esquizofrenia, um século atrás, ele afirmou que “o tratamento da demência precoce oferece poucos pontos de intervenção” (Tandon *et al.*, 2010). Até a introdução dos antipsicóticos na prática clínica, o tratamento padrão para esquizofrenia consistia em proporcionar ao paciente um ambiente seguro em um hospital psiquiátrico e esperar pela elusiva remissão espontânea da doença. A terapia com eletro choques, coma induzido por insulina e a leucotomia pré-frontal eram terapias ocasionalmente utilizadas, que foram logo desacreditadas (Swayze, 1995; Tandon *et al.*, 2010).

A introdução do primeiro antipsicótico, clorpromazina, 50 anos atrás, deu início à revolução farmacoterápica da esquizofrenia (Tandon *et al.*, 2010). Os medicamentos antipsicóticos se tornaram a pedra angular no tratamento farmacológico da esquizofrenia; três destes agentes (clorpromazina, flufenazina e haloperidol) ainda constam na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2009).

Nestes 50 anos, mais de 60 antipsicóticos foram desenvolvidos e os mesmos foram classificados em antipsicóticos de primeira geração, ou típicos, e antipsicóticos de segunda geração, ou atípicos. Os antipsicóticos de primeira geração incluem agentes como a clorpromazina, haloperidol e a ferfenazina (Kapur e Remington, 2001). Sua ação se deve principalmente ao bloqueio de receptores dopaminérgicos, mais especificamente os do tipo D₂. Antipsicóticos típicos são muito efetivos na redução dos sintomas positivos em grande parte dos pacientes, o que permitiu aos pacientes esquizofrênicos viverem fora dos hospitais em 1960. Entretanto, esses medicamentos são minimamente efetivos contra os sintomas negativos e cognitivos (Tandon *et al.*, 2010).

Os antipsicóticos de segunda geração agem em múltiplos subtipos de receptores, incluindo receptores de dopamina e serotonina. Entretanto, uma significativa parte dos pacientes continua refratária ao tratamento. Antipsicóticos atípicos podem ser divididos em : 1) antagonistas serotoninérgicos – dopaminérgicos que incluem clozapina, olanzapina, quetiapina, asenapina, risperidona, paliperidona, iloperidona e ziprasidona (Albers *et al.*, 2008; Weber & McCormack, 2009); 2) agonistas parciais de receptores dopaminérgicos: aripiprazol (Shapiro *et al.*, 2003); e 3) antagonista D₂/D₃: amisulprida (Tandon *et al.*, 2010).

A distinção entre o grupo típico e atípico depende do perfil dos receptores aos quais os fármacos se ligam, da incidência de efeitos extrapiramidais (EPS) (menor no grupo atípico), da eficácia (somente da clozapina) no grupo de pacientes “refratários ao tratamento” e da eficácia contra sintomas negativos (maior no grupo atípico) (Ascher-Svanum *et al.*, 2007; Elkis e Meltzer, 2007). Apesar dos antipsicóticos atípicos possuírem menor probabilidade de causar distúrbios de movimento, como EPS, eles estão associados com ganho de peso, elevação dos níveis de prolactina e glicose e, ainda, sedação (Snyder e Murphy, 2008).

Clozapina, o primeiro antipsicótico de segunda geração, apresenta melhora tanto de sintomas positivos como negativos e 60% dos pacientes que não respondem ao tratamento com antipsicóticos típicos podem apresentar melhora com o seu uso. A clozapina apresenta seletividade frente aos receptores dopaminérgicos, como uma afinidade ligeiramente maior pelo subtipo D₄, além de efeito bloqueador de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂. Entretanto, o maior problema com a

utilização da clozapina é o aparecimento eventual da agranulocitose (cerca de 1 a 2% dos pacientes). Devido à gravidade e a potencial letalidade deste quadro, o uso deste fármaco é restrito na prática clínica a casos refratários aos tratamentos convencionais (Crilly, 2007; Elkis e Meltzer, 2007).

A ausência de efeitos adversos motores pela clozapina levou ao otimismo de especialistas que observaram que novas terapias para esquizofrenia eram possíveis. Esforços substanciais para desenvolver uma “clozapina segura” levaram a introdução de doze adicionais antipsicóticos de segunda geração nos últimos quinze anos. Acreditando-se inicialmente serem mais eficazes e toleráveis que os 51 neurolépticos de primeira geração, estes 13 novos agentes se tornaram tratamento padrão da esquizofrenia (Tandon *et al.*, 2010). Entretanto, estudos recentes de larga escala comparando a efetividade de antipsicóticos de primeira geração *versus* antipsicóticos de segunda geração indicaram que a nova geração não apresenta maior efetividade que a primeira, não sendo associada a melhoras nos efeitos negativos ou cognitivos (Lieberman *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006; Keefe *et al.*, 2007; Swartz *et al.*, 2007). Ainda, estudos recentes de primeiro episódio esquizofrênico e de pacientes no início da doença também demonstraram esta ausência de benefícios dos antipsicóticos de segunda geração (Kahn *et al.*, 2008; Sikich *et al.*, 2008; Davidson *et al.*, 2009). Apesar de não haver diferenças significativas em relação à ação sobre os sintomas da esquizofrenia, a atipicalidade, ou em outras palavras, a habilidade de um antipsicótico não causar sintomas extrapiramidais é um atributo importante (Chen e Tandon, 2009).

Ainda não se sabe exatamente qual o mecanismo de ação responsável pela diferença clínica vista entre antipsicóticos típicos e atípicos; a determinação de tal mecanismo teria grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos atípicos. Há na literatura diversas teorias para tentar explicar o mecanismo responsável pela atipicalidade. Muitas destas teorias postulam que o perfil atípico é secundário a interações que estes fármacos exerceriam em outros receptores dopaminérgicos que não o D₂ (isto é, em D₁, D₃, D₄), ou mesmo da relação de potência de bloqueio entre eles (por exemplo, D₄/D₂, D₁/D₂) (Seeman *et al.*, 1997; Strange, 2001; Tauscher *et al.*, 2004). Outras teorias afirmam que o perfil atípico é secundário à ação dos fármacos em receptores não dopaminérgicos, em especial os receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, ou mesmo secundário à relação 5-HT_{2A}/D₂

(Meltzer *et al.*, 2003). Há também estudos que afirmam que a atipicidade é secundária a bloqueios dopaminérgicos seletivos no SNC, ou seja, alguns fármacos apresentariam maior propensão a bloquear zonas límbicas do que estriatais (Pilowsky *et al.*, 1997; Strange, 2001; Bressan *et al.*, 2003). Há ainda uma teoria que foca exclusivamente no receptor D₂, a saber, a hipótese da rápida dissociação, a qual propõe que fármacos com dissociação rápida, quando usados em doses que levam ao bloqueio de receptores D₂, modulam o sistema dopaminérgico de forma a permitir o funcionamento do sistema fisiológico, levando ao efeito antipsicótico atípico, sem precisar invocar atividade em outros receptores (Kapur e Seeman, 2001).

Por mais de 30 anos a hipótese dopaminérgica tem dominado as teorias da esquizofrenia, baseada inicialmente na observação de que drogas que aumentavam a neurotransmissão dopaminérgica, como a anfetamina e a cocaína, causavam psicose, mimetizando sintomas positivos da esquizofrenia. A administração de antagonistas de receptores NMDA (NMDAR) também é capaz de causar sintomas que mimetizam um episódio psicótico, mas, interessante, diferente da anfetamina, são capazes de induzir também sintomas cognitivos, negativos e afetivos da esquizofrenia, o que deu origem a hipótese da hipofunção glutamatérgica da esquizofrenia (Stahl, 2007).

Entretanto, a teoria da hipofunção de NMDAR não deve ser considerada contraditória a hipótese dopaminérgica, pois muitos estudos demonstram interações entre receptores dopaminérgicos e NMDAR em regiões cerebrais importantes como o hipocampo (Lisman and Otmakhova, 2001) e entre aferências glutamatérgicas e o núcleo dopaminérgico subcortical (Lisman e Grace, 2005). Outra teoria que também pode estar relacionada a outras hipóteses é o mau funcionamento de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, que gerariam uma desinibição generalizada no córtex cerebral (Stahl, 2007; Gaspar *et al.*, 2009). De fato, alterações nos interneurônios GABAérgicos, os quais recebem muitos *inputs* de neurônios glutamatérgicos, são uma das mais reproduzíveis alterações neuroanatômicas encontradas em pacientes esquizofrêncios. Estas inter-relações estão demonstradas na **figura 2**.

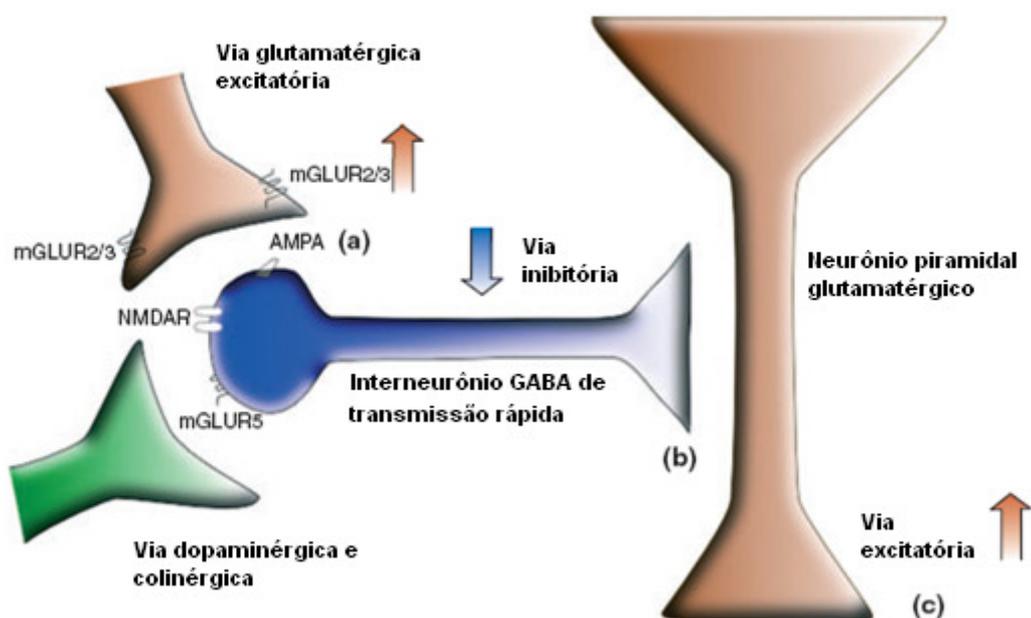


Figura 2. Circuito básico das vias neuroquímicas envolvidas na esquizofrenia. O circuito crítico envolve a participação de interneurônios GABAérgicos de rápida transmissão (b) e neurônios piramidais glutamatérgicos (c). Alterações em todos mecanismos moleculares neste circuito, incluindo receptores NMDA, AMPA, e mGluR (a e b) e suas vias intracelulares podem resultar em uma disfunção do sistema. Além disso, alterações na neurotransmissão da acetilcolina (ACh) ou dopamina podem ter participação na fisiopatologia da esquizofrenia, através da modulação destes circuitos. *Figura adaptada de Gaspar e colaboradores, 2009.*

Considerando atuais evidências, muitos autores têm concordado que a disfunção dopaminérgica pode ser secundária a outra disfunção, glutamatérgica, por exemplo, (Tuominen *et al.*, 2005; Gaspar *et al.*, 2009), e muitos estudos têm se voltado para o desenvolvimento de fármacos que atuem além dos receptores dopaminérgicos (Karam *et al.*, 2010).

Uma vez que agonistas diretos de receptores NMDA não podem ser utilizados na clínica, ligantes alostéricos como a glicina, D-serina, ou D-alanina têm sido utilizados com resultados diversos (Buchanan *et al.*, 2007). Outros alvos glutamatérgicos também têm sido alvo de pesquisa. O agonismo de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR) reverte os efeitos da fenciclidina, um antagonista NMDAR, sobre a atividade locomotora, movimentos estereotipados e níveis extracelulares de glutamato (Moghaddam e Adams, 1998). Desde então,

fármacos agonistas de mGluR do tipo R₂/R₃ (mGluR_{2/3}) têm sido desenvolvidos. Além de parecerem mais seguros que os antipsicóticos atípicos atuais, parecem apresentar uma melhora em efeitos cognitivos e melhor tolerabilidade. Esse mecanismo parece tão promissor que grandes empresas farmacêuticas, como Eli Lilly, Merck, Johnson & Johnson e Pfizer estão competindo na busca de fármacos para tratar esquizofrenia com alvo nesses receptores (Snyder e Murphy, 2008).

Além da neurotransmissão glutamatérgica, estudos *postmortem* e estudos de imagem em pacientes esquizofrênicos têm identificado anormalidades na neurotransmissão GABAérgica que estariam associadas ao mau funcionamento cognitivo. Receptores GABA_A têm um importante papel na mediação da atividade do córtex pré-frontal dorsolateral, o qual é crítico para memória de trabalho (Rao *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que a diminuição de GABA contribui para uma sincronização prejudicada em neurônios piramidais e acredita-se que esta diminuição estaria relacionada ao prejuízo de memória de trabalho em pacientes esquizofrênicos (Lewis e Moghaddam, 2006). MK-0777, um modulador alostérico GABA_{Aα2}, foi desenvolvido com o objetivo de aumentar a neurotransmissão GABAérgica. Em um estudo inicial duplo-cego controlado, pacientes esquizofrênicos, com doses estáveis de antipsicóticos, demonstraram uma melhora em três testes de memória, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa (Lewis *et al.*, 2008).

O sistema colinérgico também tem recebido especial atenção como potencial alvo para tratamentos de sintomas negativos e cognitivos. Isto porque neurônios colinérgicos inervam estruturas anatômicas relacionadas à esquizofrenia e participam de processos que estão alterados nos pacientes como atenção, memória de trabalho e comportamentos motivacionais (Berman *et al.*, 2007). Recentemente, vareniclina (um agonista parcial de receptores α4β2 e um agonista pleno de receptores α7) foi avaliado em um estudo clínico aberto. Embora tenham sido reportados efeitos adversos no humor, vareniclina induziu uma significativa melhora na memória verbal sem, entretanto, melhorar a memória espacial. Além disso, levou a uma diminuição do índice de fumantes, que chega a 80% entre pacientes esquizofrênicos (Smith *et al.*, 2009; Karam *et al.*, 2010).

Uma atual revisão realizada por Tandon e colaboradores (2010) sobre a esquizofrenia demonstrou que 177 medicamentos estão em desenvolvimento, englobando desde fármacos em fase pré-clínica até medicamentos em fase clínica. Estes potenciais novos tratamentos visam tratar sintomas relacionados à esquizofrenia como: psicose, sintomas positivos, sintomas negativos e cognição. Em adição aos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos, uma variedade de alvos glutamatérgicos, colinérgicos, gabaérgicos, neuropeptidérgicos e canabinóides são abrangidos. Dentre todos estes potenciais novos medicamentos, nenhum demonstrou até o momento benefícios significativos, ou apresentaram resultados não replicáveis ou apresentaram resultados controversos. Isto demonstra que ainda há imensos desafios no desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e mais seguros, particularmente porque ainda não se sabe quais alvos devem ser atingidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Testes *in vivo*

4.1.1. Animais

Camundongos CF1, machos com idade entre 4 e 5 semanas (25 - 30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) foram utilizados. Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por um período mínimo de 96 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia - UFRGS. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas de 17x28x13 cm com, no máximo, 08 animais por caixa. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante (23 ± 1 °C), sob sistema de exaustão (estantes ventiladas Alesco®) e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração certificada Nuvital®). Nos experimentos realizados com administração das substâncias-teste por via oral, os animais passaram por um período de 3 horas de jejum antes do teste.

Imediatamente após a finalização dos experimentos, os animais foram submetidos isoladamente à eutanásia pelo método de deslocamento cervical. As carcaças foram acondicionadas em embalagem plástica apropriada e armazenadas em freezer a - 20 °C até o recolhimento (semanal) pela Aborgama do Brasil.

Os resíduos químicos foram acondicionados em frascos apropriados e recolhidos pela COSAT-Faculdade de Farmácia.

4.1.2. Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volume igual a 1 mL/100 g de massa corporal pela via oral ou intraperitoneal e com 1 mL/200 g de massa corporal pela via subcutânea.

Todos os grupos experimentais foram constituídos de 07 a 12 animais. O tamanho amostral foi calculado utilizando o programa estatístico Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®), considerando um valor de alfa de 0,05, poder do teste de 0,8 e o teste a ser utilizado em cada experimento. Como parâmetros para as diferenças e desvios padrões esperados foram utilizados as referências bibliográficas citadas em cada experimento proposto.

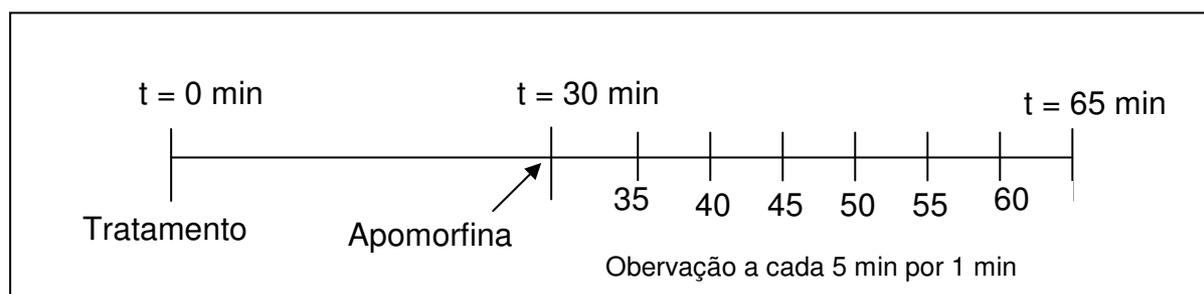
Para utilização nos ensaios biológicos, LASSBio-579, LASSBio-579.HCl e LASSBio-579.HCl.β-ciclodextrina foram suspensos em solução salina acrescida de polissorbato 80 (Tween 80®) 1%. As demais drogas e fármacos foram dissolvidos diretamente em solução salina ou suspensos com auxílio de polissorbato 80 1% e aparelho de ultra-som, quando necessário. O grupo controle recebeu solução salina acrescida de polissorbato 80 (Tween 80®) 1%.

4.1.3. Bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina

Este modelo é baseado na indução de um estado hiperdopaminérgico induzido pela administração da apomorfina, um agonista dopaminérgico, e é classicamente relacionado com agitação motora, um dos sintomas positivos da esquizofrenia (Costall, *et al.*, 1978; Buttini, *et al.*, 2009). O bloqueio dos efeitos comportamentais induzidos pela apomorfina é uma resposta observada tanto para antipsicóticos típicos como atípicos; por este motivo, este modelo é utilizado inicialmente para triagem de potenciais novos antipsicóticos.

Camundongos foram tratados com LASSBio-579.HCl (dose equivalente a 5 mg/kg de LASSBio579 na forma de base livre, v.o.), LASSBio-579.HCl.β-ciclodextrina (dose equivalente a 5 mg/kg de LASSBio579 na forma de base livre, v.o.), β-ciclodextrina (5mg/kg, v.o.) veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (15 mg/kg, v.o.). Em seguida, foram colocados individualmente em gaiolas de metal, onde permaneceram durante meia hora para adaptação. Transcorrido este período, os animais receberam uma injeção de apomorfina 4 mg/kg s.c. ou veículo s.c., sendo imediatamente recolocados nas gaiolas, onde permaneceram por trinta minutos. Neste período, os animais foram observados a cada 5 minutos durante 1 minuto (**Esquema 1**), gerando assim 6 observações de 1min cada onde se registraram os seguintes parâmetros: maior número de patas na grade, escalada contínua ou intermitente e presença ou ausência de estereotipia. Para fins de análise, é considerado o índice de escalada, calculado a partir da soma dos índices gerados em cada intervalo:

- 0: nenhuma pata na grade lateral e não apresenta estereotipia.
- 1: nenhuma pata na grade lateral e apresenta estereotipia.
- 2: 1, 2 ou 3 patas na grade lateral.
- 3: escalada intermitente durante 1min de observação.
- 4: escalada contínua durante 1min de observação.



Esquema 1. Esquema de tratamento utilizado no experimento de bloqueio do comportamento de escalada (*climbing*) induzido por apomorfina em camundongos.

A síntese de LASSBio-579.HCl. β -ciclodextrina para utilização neste trabalho foi realizada pelo laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – LASSBio, UFRJ. A síntese envolveu a mistura do composto alvo, LASSBio-579.HCl, com ciclodextrina em água, numa proporção molar de 1:1. Manteve-se agitação constante por 48h à temperatura ambiente e protegida da luz para evitar degradações. O resíduo sólido da suspensão resultante foi filtrado utilizando filtro 0,45 μ M Millipore e quantificado por espectrometria de ultravioleta.

4.1.4. Hiperlocomoção induzida por antagonista NMDAR

Em roedores, a administração de antagonistas NMDAR, como a cetamina, é capaz de causar um aumento da atividade locomotora espontânea dos animais. Este comportamento vem sendo utilizado como modelo animal para avaliar o perfil de novos potenciais antipsicóticos, pois a hiperlocomoção induzida por cetamina pode ser bloqueada por antipsicóticos atípicos, mas não por típicos, em doses que não prejudicam a atividade locomotora espontânea dos animais (Satow *et al.*, 2009). Para verificar o perfil de LASSBio579, os animais foram administrados com a substância-teste (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/kg, v.o.), controle positivo clozapina 1 mg/kg ou haloperidol 0,01 mg/kg ou controle negativo salina + polissorbato 80 1%, pela via oral, e imediatamente colocados na caixa de locomoção para ambientação por 30 minutos. Após este período, os animais receberam pela via sub-cutânea o antagonista NMDAR cetamina, na dose de 10 mg/kg ou solução salina (grupo controle) e foram novamente colocados na caixa de locomoção, onde foram observados por 20 minutos. Neste intervalo de tempo foi observado o número de *crossings* (número de quadrantes que os animais percorrem).

4.2. Testes *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados no laboratório de Plasticidade Neuroglial - Departamento de Bioquímica da UFRGS, em colaboração com o grupo do professor Dr. Carlos Alberto Gonçalves.

Após os experimentos os reagentes químicos foram armazenados em frascos apropriados para posterior recolhimento pelo departamento de química da UFRGS. Resíduos biológicos foram incinerados. Resíduos radioativos foram armazenados em local específico no Departamento de Bioquímica, que posteriormente encaminhou para tratamento.

4.2.1. Animais

Ratos Wistar machos (30 dias de idade), provenientes do departamento da Bioquímica da UFRGS, foram utilizados. Os animais foram mantidos, em grupos de no máximo, 5 animais por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com livre acesso a água e comida.

4.2.2. Preparação e incubação de fatias hipocâmpais

Os animais foram decapitados com guilhotina, o encéfalo removido e colocado em uma solução salina resfriada com a seguinte composição (em mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄, e 10 glicose, com pH 7,4. Os hipocâmpos foram dissecados e fatias transversas de 0,3 mm foram obtidas usando o aparelho McIlwain Tissue chopper. As fatias foram transferidas imediatamente para placas de cultura de 24 poços, cada poço contendo 0,3 mL do meio fisiológico e somente uma fatia. Para estabilizar as fatias, o meio foi trocado a cada 15 min com meio salina fresco a temperatura ambiente (mantida a 25°C) durante 120 min. Após este período de estabilização, é realizado o tratamento das fatias, que consistiram na adição de LASSBio-579 (0,1; 1,0; 10 ou 20 µM), clozapina (10 µM) ou haloperidol (10 µM) por um período de 1h a 30°C. Após este período o meio é coletado e estocado a -20 °C para posterior medida de S100B ou utilizado para reação de LDH. As fatias seguem para os demais testes.

4.2.3. Avaliação da integridade celular e viabilidade celular

As fatias foram tratadas como especificado no item 4.2.2 e após o período de tratamento (1h), realizou-se os testes de integridade e viabilidade celular.

A integridade da membrana foi avaliada pela medida de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica que é liberada no citoplasma após a perda da integridade da membrana. A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão do piruvato para lactato e paralelamente a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da LDH. A atividade enzimática é calculada através da diminuição da absorvância da solução de NADH em 492 nm. A atividade da LDH foi determinada por um kit comercial colorimétrico (Doles, Brasil). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

A viabilidade celular foi analisada segundo o teste colorimétrico de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT-Sigma). MTT (amarelo) é reduzido para roxo formazan, devido à atividade metabólica celular das células viáveis. O corante é incubado durante 30 min a 30 °C, então o meio é retirado e adiciona-se solução de DMSO 100%. As placas ficam sob agitação por cerca de 30 min. Finalmente, transfere-se 0,2 ml para placa de 96 poços e lê-se a 540 e 620 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (fatias sem tratamento).

4.2.4. Captação de glutamato

Fatias tratadas como descrito no item 4.2.2. foram incubadas durante 05 minutos a 37 °C em HBSS (solução salina balanceada de Hanks) contendo (em mM): 137 NaCl; 0,63 Na₂HPO₄; 4,17 NaHCO₃; 5,36 KCl; 0,44 KH₂PO₄; 1,26 CaCl₂; 0,41 MgSO₄; 0,49 MgCl₂, e 5,55 de glicose, ajustada a pH 7,4. O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1 mM L-glutamato e 0,66 µCi/mL de L-[2,3-³H] glutamato. A incubação foi interrompida após 5 min pela remoção do meio e as fatias foram lavadas duas vezes com HBSS gelada. As fatias foram então lisadas por adição de solução contendo 0,1 M de NaOH e 0,01% de SDS. A radioatividade foi medida em cintilador. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle. A medida

de proteínas foi realizada pelo método de Lowry modificado, descrito por Peterson (1977).

4.2.5. Medida de S100B

A secreção de S100B nas fatias hipocâmpais foi medida pelo ensaio de ELISA (Leite *et al.*, 2008). Brevemente, 50 µl de amostra (tratadas como descrito no item 4.2.2) mais 50 µl de Tampão Tris-Ca⁺² foram incubados por 2 h sobre a placa previamente coberta com anticorpo anti-S100B monoclonal. O anticorpo anti-S100 policlonal foi incubado por 30 min seguido de um anticorpo anti-IGg conjugado a peroxidase por mais 30 min. Adicionou-se o-phenylenediamina (OPD) (que é oxidada pela peroxidase gerando coloração) e manteve-se por 30 min no escuro. A reação de cor com o-phenylenediamina (OPD) foi medida a 492 nm. A curva padrão para S100B variou de 0,001 a 1 ng/mL. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

4.3. Ética

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios éticos relatados por Goldim (2000) e as normas do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), Resolução 714, de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e a Lei nº 11794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS, nº 2008244) (ANEXO I).

4.4. Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o *software* Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation ®). Para escolha dos testes, foi levado em consideração a distribuição dos dados, o delineamento experimental e o tipo de variável. Os testes utilizados estarão especificados em cada experimento, na sessão de resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Testes *in vivo*

5.1.1. Bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina

LASSBio579.HCl.β-ciclodextrina não foi capaz de inibir o comportamento de escalada induzido por apomorfina, da mesma forma que LASSBio579.HCl e o controle negativo β-ciclodextrina; diferentemente, os antipsicóticos clozapina e haloperidol foram capazes de inibir este comportamento, como demonstrado na **figura 3**.

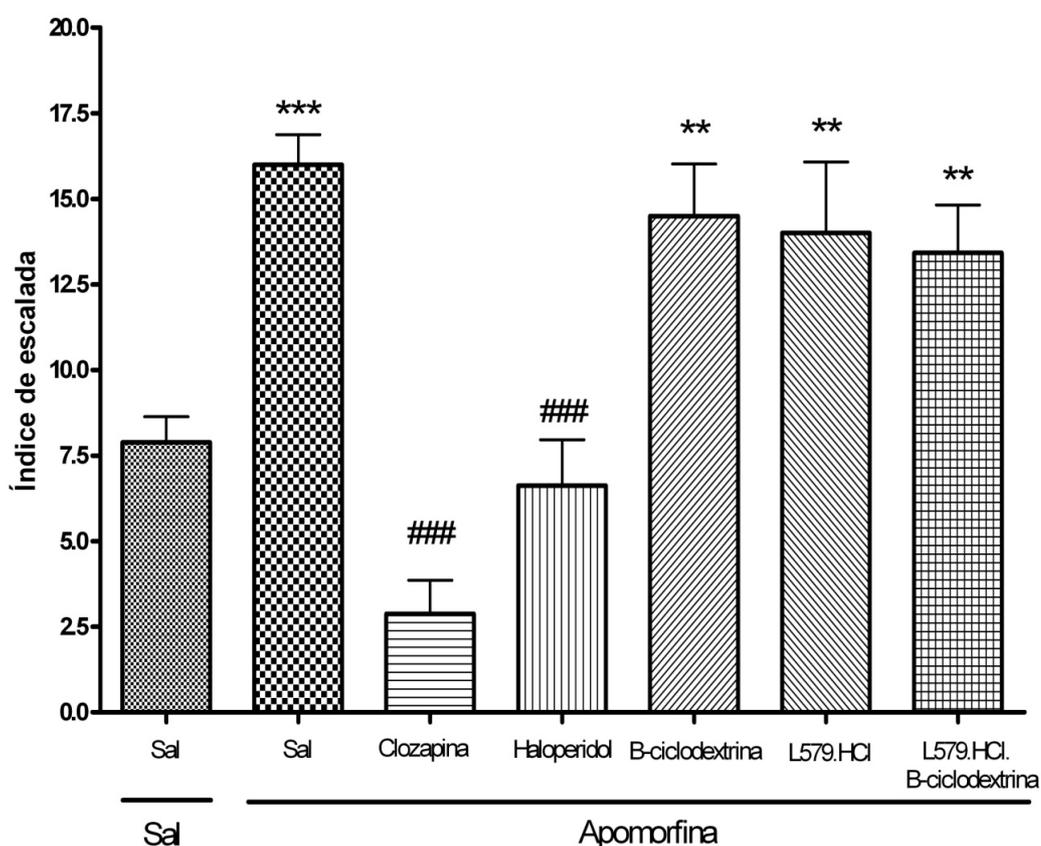


Figura 3. Efeito de clozapina (15 mg/kg, v.o.), haloperidol (4mg/kg, v.o.), LASSBio579.HCl (L579.HCl) (dose equivalente a 5mg/kg de LASSBio579 base livre, v.o.) e LASSBio579.HCl.β-ciclodextrina (L579. HCl. β-ciclodextrina) (dose equivalente a 5mg/kg de LASSBio579 na forma de base livre, v.o.) sobre o comportamento de escalada induzido por apomorfina (4,0 mg/kg, s.c.). Resultados expressos como média + erro padrão. ANOVA de uma via *post hoc Student Newman Keuls* ($F_{6,58} = 17,260$ $p < 0,001$). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO: ### $p < 0,001$. SAL: veículo (salina 1% polissorbatado 80).

5.1.2. Hiperlocomoção

LASSBio-579 inibiu a hiperatividade locomotora induzida por cetamina na dose de 0,5 mg/kg, sendo que o efeito máximo atingido se deu também nesta dose. O antipsicótico típico haloperidol não foi capaz de inibir a hiperlocomoção diferente do antipsicótico atípico clozapina, como demonstrado na **figura 4**.

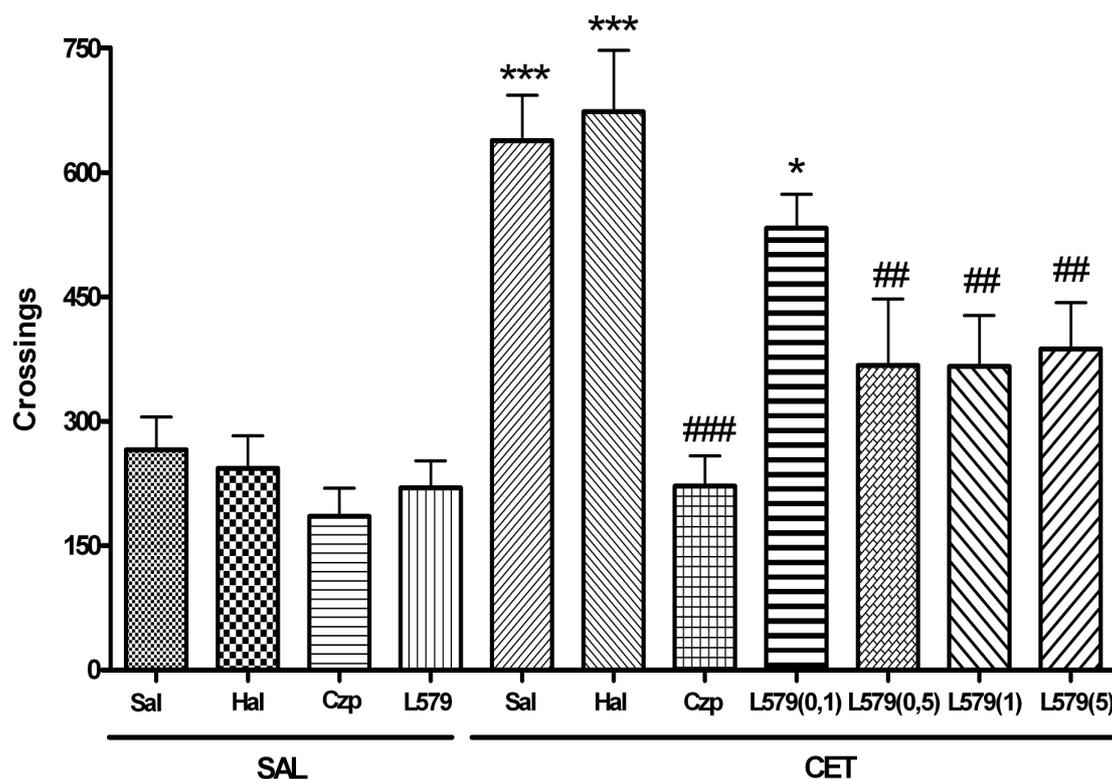


Figura 4. Efeito de haloperidol (Hal) (0,01mg/kg, v.o.), clozapina (Czp) (1,0 mg/kg, v.o.) e LASSBio579 (L579) (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/kg, v.o.) sobre a hiperlocomoção induzida por cetamina (10 mg/kg, s.c.). Resultados expressos como média + erro padrão. ANOVA de uma via *post hoc Student Newman Keuls* ($F_{10,109} = 11,443$ $p < 0,001$). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL: *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. Diferença significativa em relação ao grupo SAL+CET: ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$. SAL: veículo (salina 1% polissorbato 80).

5.2. Testes *in vitro*

5.2.1. Integridade e viabilidade celular

LASSBio-579, clozapina e haloperidol não induziram morte celular nem alteraram a viabilidade das células de forma significativa nas concentrações avaliadas (**Figura 5**).

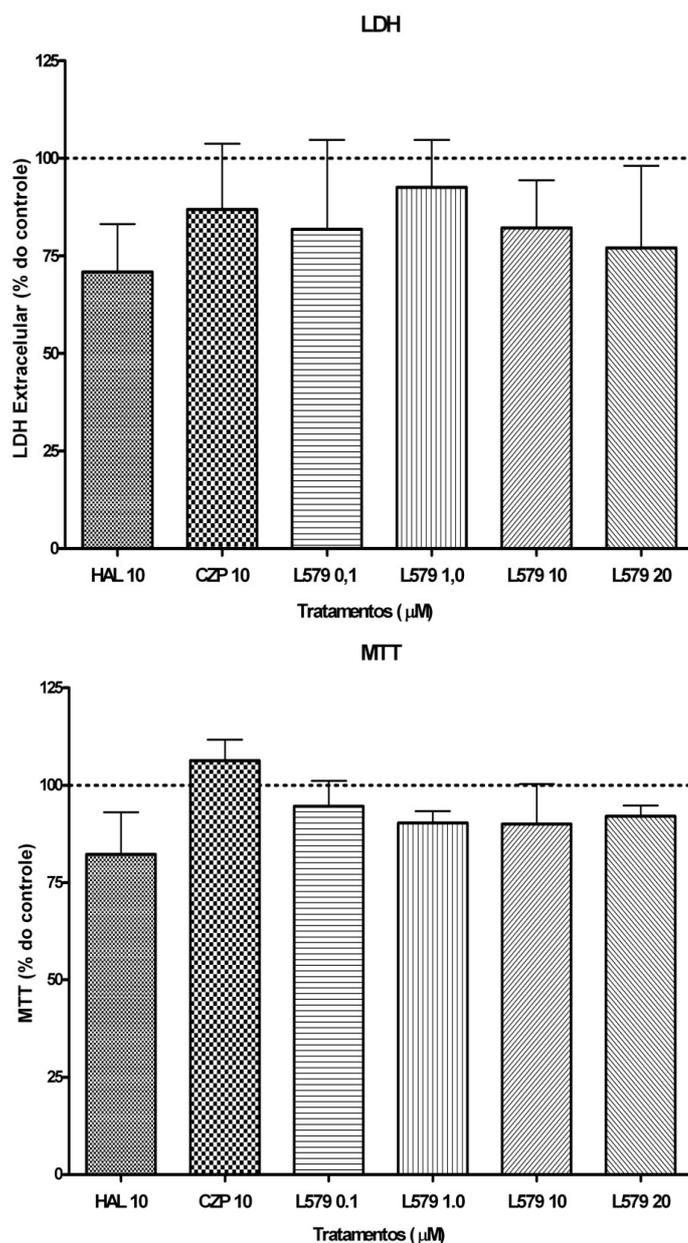


Figura 5. Avaliação de haloperidol (HAL) (10 µM), clozapina (CZP) (10 µM) e LASSBio579 (L579) (0,1; 1,0; 10 e 20 µM) sobre a integridade (LDH) e viabilidade celular (MTT) em fatias hipocâmpais de ratos. Resultados expressos como média + erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. SAL: veículo (salina 1% polissorbato 80).

5.2.2. Captação de Glutamato

LASSBio-579 foi capaz de inibir a captação de glutamato na mínima (0,1 μM) e máxima (20 μM) concentrações avaliadas, apresentando uma curva de efeito em forma de U invertido. O antipsicótico clozapina também foi capaz de inibir a captação de glutamato na concentração avaliada (10 μM), diferente do antipsicótico haloperidol (**Figura 6**).

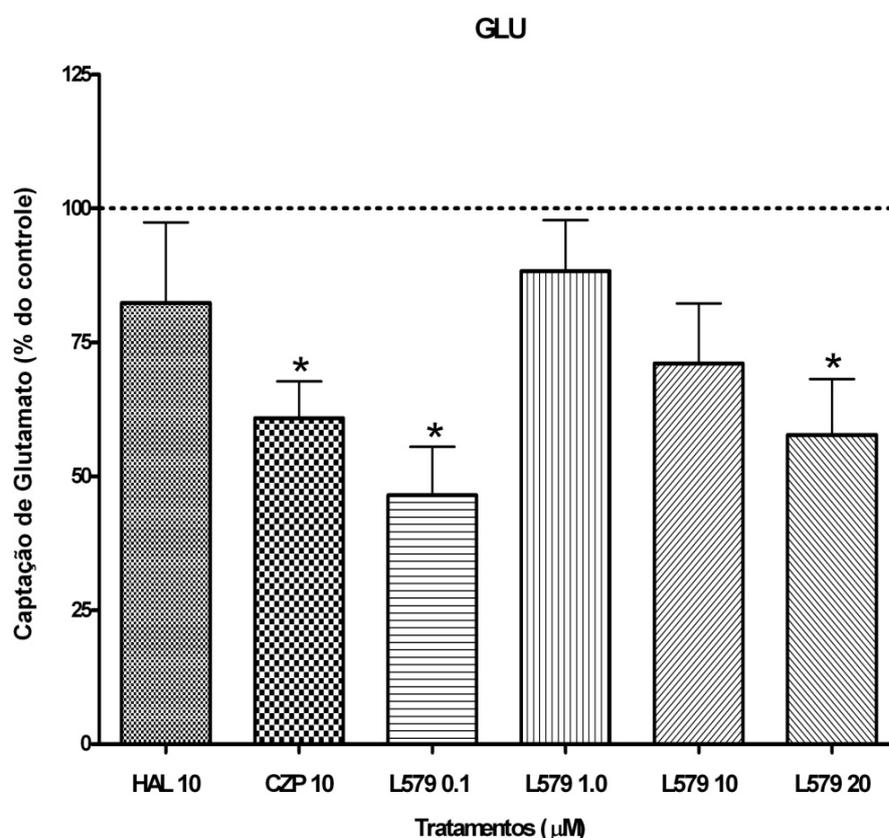


Figura 6. Avaliação do efeito de haloperidol (HAL) (10 μM), clozapina (CZP) (10 μM) e LASSBio579 (L579) (0,1; 1,0; 10 e 20 μM) sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais de ratos. Resultados expressos como média + erro padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA de uma via *post hoc* Dunnett ($F_{6,32} = 2,987$ $p < 0,024$). Diferença significativa em relação à captação de glutamato das fatias controle (100%): * $p < 0,05$. SAL: veículo (salina 1% polissorbato 80).

5.2.3. Medida da secreção de S100B

LASSBio-579 foi capaz de inibir a secreção de S100B na mínima (0,1 μM) e na máxima (20 μM) concentração avaliada, apresentando uma curva de efeito em forma de U invertido. Os antipsicóticos clozapina e haloperidol não alteraram de forma significativa a secreção de S100B (**Figura 7**).

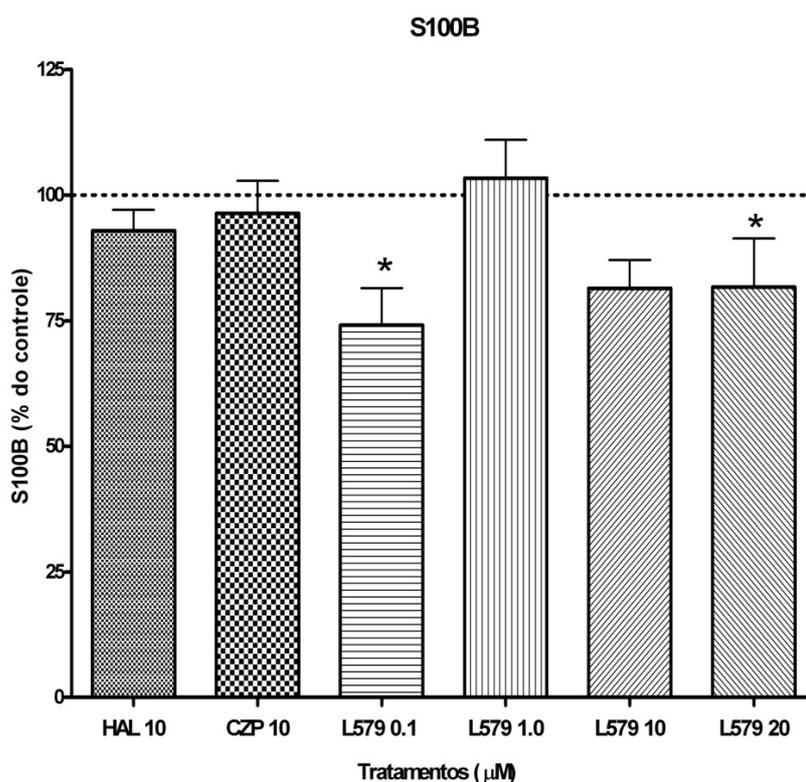


Figura 7. Avaliação de haloperidol (HAL) (10 μM), clozapina (CZP) (10 μM) e LASSBio579 (L579) (0,1; 1,0; 10 e 20 μM) sobre a secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos. Resultados expressos como média + erro padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA de uma via *post hoc* Dunnett ($F_{6,41} = 4,104$ $p < 0,003$). Diferença significativa em relação à secreção de S100B basal (100%): * $p < 0,05$. SAL: veículo (salina 1% polissorbato 80).

6. DISCUSSÃO

A inclusão de LASSBio-579.HCl em β -ciclodextrina levou a uma perda da atividade de LASSBio-579 no modelo preditivo de atividade antipsicótica. Este é um achado inesperado, visto que muitos estudos têm apontado o uso de ciclodextrinas como uma ferramenta farmacêutica útil para elevar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (Dahan *et al.*, 2010). Entretanto, há estudos que demonstram que nem sempre a técnica é capaz de levar a uma melhora do perfil farmacocinético (Carrier *et al.*, 2007) não se podendo assim prever a eficácia da técnica, sendo citado por alguns autores como um processo baseado em tentativa e erro (Gamsiz *et al.*, 2010). Mas, é importante salientar que o próprio LASSBio-579.HCl não apresentou atividade, na mesma dose em que o LASSBio579 base livre foi ativo no modelo de escalada. Uma hipótese para explicar este fato é que a adição de cloridrato à molécula de LASSBio-579 tenha resultado em uma alteração de parâmetros moleculares (como, por exemplo, formação de pontes de hidrogênio) que afetou sua interação com os receptores e/ou farmacocinética, levando à perda de sua eficácia.

Outra questão a considerar é que o perfil farmacocinético que demonstrou baixa penetração cerebral (6,3%) e baixa biodisponibilidade (0,6%) também foi determinado com LASSBio-579.HCl (Conrado *et al.*, 2008), em ratos, enquanto a maior parte dos dados de eficácia pré-clínica são oriundos de experimentos realizados em camundongos, com a base livre. Por se tratarem de espécies diferentes, apresentando especialmente metabolismo de xenobióticos diferenciados (Colburn e Heath, 2004) nada exclui a possibilidade de que em camundongos os valores de penetração cerebral e biodisponibilidade de LASSBio-579 base livre sejam diferentes dos valores observados em ratos.

Os resultados *in vivo* publicados por Neves e colaboradores (2003, 2008; 2010), e também nesta Dissertação, demonstram inequivocamente que LASSBio-579 base livre apresenta eficácia em diversos modelos animais preditivos de atividade antipsicótica, mesmo em baixas doses, como observado no modelo de hiperlocomoção, onde LASSBio-579 foi ativo na dose de 0,5 mg/kg (Figura 4), o que sugere que a base livre tenha um perfil farmacocinético mais favorável, em camundongos, ou que a substância seja bastante potente ou, ainda, que a atividade esteja relacionada à presença de metabólitos. Essas questões merecem um estudo futuro mais aprofundado.

A avaliação da relação dose-resposta no modelo de hiperlocomoção induzida por cetamina não permitiu a observação uma curva dose efeito, na faixa de doses avaliadas. Há um aumento de efeito quando se compara a dose de 0,5 mg/kg em relação à dose de 0,1 mg/kg; entretanto, o efeito máximo já é atingido em 0,5 mg/kg, sugerindo que a curva dose efeito poderia estar compreendida entre as duas primeiras doses utilizadas, ou ainda que a próxima dose onde um aumento do efeito seria observado está acima das doses trabalhadas.

A eficácia no modelo de hiperlocomoção induzido pela administração de antagonistas NMDAR tem sido considerada indicativo de atipicalidade, uma vez que apenas antipsicóticos atípicos são capazes de prevenir o comportamento de hiperatividade locomotora de roedores, em doses que não afetam a locomoção espontânea dos animais (Satow *et al.*, 2009). O antipsicótico atípico clozapina foi capaz de prevenir a hiperlocomoção dos animais, semelhante à LASSBio-579 e diferente do antipsicótico típico, haloperidol. Este resultado sugere uma atividade semelhante aos antipsicóticos atípicos de LASSBio-579, fortalecendo a hipótese apresentada por Neves e colaboradores (2010).

Além do modelo de hiperlocomoção induzida por antagonistas NMDAR, diversos modelos animais vêm sendo desenvolvidos com sucesso através da administração destes antagonistas, mimetizando sintomas positivos, negativos e cognitivos e avaliando a hipótese do desenvolvimento neuronal comprometido na esquizofrenia (Mouri *et al.*, 2007). A hipótese de disfunção neuronal glutamatérgica na esquizofrenia surgiu da observação de que a intoxicação com fenciclidina, um antagonista NMDAR, mimetizava proximamente os sintomas da esquizofrenia (Javitt e Zukin, 1991). Um ensaio clínico realizado em 1959 demonstrou que a administração aguda de fenciclidina era capaz de causar uma psicose esquizofrênica transitória em voluntários saudáveis e exacerbar os sintomas de pacientes esquizofrêncios (Luby *et al.*, 1959; Javitt e Zukin, 1991).

Fatias cerebrais tratadas de forma aguda, particularmente fatias do hipocampo, têm sido amplamente utilizadas para investigar parâmetros eletrofisiológicos e metabólicos neuronais devido à preservação parcial dos circuitos neuronais e um controle adequado do meio extracelular (Sajikumar *et al.*, 2005). Estas preparações também têm sido usadas para avaliação de atividade astrócitária,

incluindo a captação de glutamato (Thomazi *et al.*, 2004) e a secreção de S100B, uma proteína ligante de cálcio que modula a proliferação e diferenciação de neurônios e glia através de mecanismos proliferativos e apoptóticos (Buyukuysa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Estudos morfológicos têm confirmado que estas fatias mantêm a integridade de um grande número de terminais sinápticos, acompanhada pelo processo de intumescimento glial (Aitken *et al.*, 1995), e também a presença funcional das *gap junctions* (Nagy *et al.*, 2000).

Fatias hipocâmpais foram utilizadas neste trabalho para um estudo onde se buscou avaliar a atividade de LASSBio-579 e dos antipsicóticos haloperidol e clozapina sobre a sobrevivência e viabilidade das células neuronais, bem como sua ação sobre a captação de glutamato e secreção da proteína S100B.

LASSBio-579 (0,1 – 20 μM), clozapina (10 μM) e haloperidol (10 μM) não alteraram significativamente a sobrevivência nem a viabilidade celular nas fatias hipocâmpais (medidas através da concentração de LDH e pelo ensaio de MTT, respectivamente), nas concentrações avaliadas. Entretanto, foi possível observar que, em comparação com a clozapina e LASSBio-579, haloperidol induziu morte celular e redução da viabilidade celular de forma importante, embora não estatisticamente significativa. É importante ressaltar que este foi um estudo exploratório e a avaliação de outras concentrações e o aumento do número de fatias estudadas são necessários para uma conclusão mais robusta relativa à atividade destes compostos sobre a integridade e viabilidade celular em fatias hipocâmpais tratadas de forma aguda. Mesmo para clozapina e haloperidol, estudos utilizando fatias hipocâmpais não foram encontrados; entretanto, estudos utilizando culturas isoladas de células gliais (linhagem C6 e oligodendrogliais), demonstraram resultados semelhantes para haloperidol, clozapina e risperidona (antipsicótico atípico), onde o tratamento das culturas com estes compostos não resultou em aumento de morte celular (Quincozes-Santos *et al.*, 2008; Steiner *et al.*, 2010).

LASSBio-579 foi capaz de inibir a captação de glutamato nas concentrações de 0,1 e 20 μM , ou seja na menor e na maior concentrações avaliadas, apresentando uma curva-efeito em forma de U invertido (*bell shaped*). Clozapina também foi capaz de inibir a captação de glutamato diferente de haloperidol, que não influenciou a mesma. Os dados de literatura para antipsicóticos em relação à

captação de glutamato são escassos. Um estudo demonstra que a risperidona, antipsicótico atípico, age aumentando, enquanto haloperidol não altera a captação de glutamato em células gliais isoladas (Quincozes-Santos *et al.*, 2010). Entretanto, outro estudo demonstra que haloperidol atua de forma seletiva para sinaptossomas obtidos de diferentes localizações cerebrais, diminuindo a captação de glutamato em sinaptossomas obtidos de regiões subcorticais enquanto não influencia a captação de sinaptossomas corticais e estriatais (Burger, *et al.*, 2005). No entanto, os estudos citados acima utilizam técnicas e concentrações muito diferentes, o que pode contribuir para as divergências encontradas. Vale lembrar que no presente estudo utilizamos apenas uma concentração dos antipsicóticos escolhidos; assim um estudo mais abrangente, com mais concentrações ainda é necessário para inferirmos sobre a atuação destes antipsicóticos sobre a captação de glutamato.

A ação sobre a inibição da captação de glutamato pode ser relevante no tratamento da esquizofrenia. Diversos estudos têm demonstrado a relação da hipofunção de NMDAR com a esquizofrenia (Coyle, *et al.*, 2003). Uma vez que LASSBio-579 é capaz de diminuir a captação de glutamato, mais glutamato fica disponível na fenda sináptica, o que poderia compensar a hipofunção glutamatérgica. Entretanto, a liberação excessiva de glutamato também poderia contribuir para a excitotoxicidade e o dano celular. Além disso, há outras hipóteses para uma redução na sinalização glutamatérgica; transportadores glutamatérgicos são importantes reguladores da neurotransmissão excitatória e são essenciais para manutenção dos níveis fisiológicos de glutamato (Conti e Weinberg, 1999; Danbolt, 2001). Um aumento da captação de glutamato pode levar a uma transmissão glutamatérgica deficiente. A possibilidade de que o aumento da captação de glutamato tenha um papel importante na esquizofrenia surgiu da observação de que a clozapina é capaz de reduzir a expressão e a função do GLT1 (transportador de membrana responsável pelo transporte majoritário de glutamato) (Rothstein *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997), de forma intensa e seletiva, desta forma aumentando os níveis de glutamato extracelular (Melone *et al.*, 2001, 2003), o que corrobora os dados encontrados neste trabalho.

Um estudo realizado com amostras de córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos demonstrou que a expressão de GLT1 era significativamente maior do que de pacientes com ausência de desordens psiquiátricas; além disso,

demonstrou que em amostras de pacientes tratados com antipsicóticos típicos e atípicos esta expressão encontrava-se diminuída (Matute *et al.*, 2005). Um estudo *in vitro* encontrou os mesmos resultados observados no estudo anterior, indicando ainda que a clozapina diminui a expressão e a função dos transportadores GLT1 de uma forma que envolveu diretamente os astrócitos (Vallejo-Illarramendi, 2005). Este é um mecanismo de pelo qual LASSBio-579 poderia estar atuando também, uma vez que inibiu a captação de glutamato de forma semelhante a clozapina.

Outro parâmetro que pode ser avaliado por técnicas *in vitro* é a secreção de S100B, proteína que se encontra elevada em pacientes esquizofrênicos, e apresenta funções essenciais para células neuronais. A proteína S100B é principalmente produzida e secretada por astrócitos e exerce efeitos parácrinos e autócrinos nos neurônios e glia. Atua regulando uma variedade de mecanismos celulares como proliferação, diferenciação, metabolismo energético e modificações no citoesqueleto celular. Curiosamente, a secreção de S100B exerce tanto efeitos tróficos como efeitos tóxicos dependendo da concentração; concentrações nanomolares possuem uma ação neuroprotetora enquanto concentrações micromolares promovem a apoptose (Rothermundt *et al.*, 2003, 2004a).

LASSBio-579 foi capaz de inibir a secreção de S100B, coincidentemente nas mesmas concentrações que foi capaz de inibir a captação de glutamato, apresentando, da mesma forma, uma curva-efeito na forma de U invertido. Clozapina e haloperidol não influenciaram a secreção de S100B em nosso trabalho. Entretanto, um estudo presente na literatura demonstra uma redução na secreção de S100B induzida tanto por haloperidol quanto para clozapina (Steiner *et al.*, 2010). A diferença provavelmente esteja relacionada à técnica empregada, uma vez que utilizamos o modelo de tratamento agudo de fatias hipocâmpais, enquanto o estudo mencionado utilizou células gliais isoladas.

Embora já existam alguns estudos tentando correlacionar a secreção de S100B com a captação de glutamato, ainda não há uma relação direta entre estes dois parâmetros; estudos demonstram que a adição de altas concentrações de glutamato exógeno em cultura primária de neurônios hipocâmpais leva a uma diminuição na secreção de S100B induzida por condições isquêmicas. Entretanto, essa diminuição não é observada em condições normais (Gonçalves *et al.*, 2002;

Tramontina *et al.*, 2006), como foi realizado neste estudo. Apesar dos mecanismos não estarem elucidados, os resultados obtidos até o momento demonstram que LASSBio-579 é capaz de modular a captação de glutamato e a secreção de S100B, parâmetros relevantes na esquizofrenia.

Estudos têm demonstrado que a concentração de S100B encontra-se aumentada no fluido cérebro-espinhal e no soro de pacientes esquizofrênicos, especialmente durante estágios agudos da doença (Rothermundt *et al.*, 2001, 2004 a,b; Sarandol *et al.*, 2007). Um estudo histológico recente demonstrou que regiões corticais de pacientes esquizofrênicos apresentavam maior quantidade de glia S100B-imunopositiva, particularmente na área pré-frontal dorsolateral (Steiner *et al.*, 2008b). Além disso, duas meta-análises recentes demonstraram consistentemente níveis elevados de S100B em pacientes esquizofrênicos (Schroeter *et al.*, 2009; Schroeter e Steiner, 2009).

Alguns estudos sugerem que os níveis aumentados de S100B poderiam estar associados ao tratamento com antipsicóticos (Schroeter *et al.*, 2003). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado os níveis aumentados no primeiro episódio esquizofrênico e mesmo em pacientes não tratados. Zhang e colaboradores (2010) demonstraram que os níveis séricos de S100B encontram-se aumentados tanto em pacientes novos não tratados como em pacientes tratados cronicamente; entretanto, os pacientes tratados apresentam níveis atenuados em relação aos pacientes não tratados, não se diferenciando pacientes tratados com antipsicóticos típicos de atípicos.

Ainda há dúvidas se os níveis séricos de S100B poderiam prever os níveis cerebrais. No estudo realizado por Rothermundt e colaboradores (2004) os níveis séricos foram correspondentes aos níveis encontrados no fluido cérebro-espinhal em todos os grupos avaliados – pacientes tratados, pacientes não tratados e grupo controle. Os autores sugerem que por se tratar de uma proteína com baixo peso molecular (21 kDa), esta poderia ultrapassar a barreira hemato-encefálica facilmente. Entretanto, como a proteína S100B pode ser encontrada fora do sistema nervoso central, como por exemplo, nos adipócitos, ainda há muita discussão sobre o assunto, e mais estudos ainda são necessários para confirmar esta relação.

As evidências apontadas demonstram que o aumento da liberação de S100B com consequente dano celular pode ser parte de um processo neurodegenerativo com papel fundamental na gênese da esquizofrenia, e neste ponto LASSBio-579 se demonstra superior aos antipsicóticos avaliados, uma vez que foi o único capaz de inibir a secreção de S100B, nas concentrações avaliadas. Um estudo avaliando a risperidona demonstrou que a mesma estimula a secreção de S100B (Quincozes-Santos *et al.* 2009) Neste trabalho, os autores apontam que a risperidona poderia ter uma ação neuroprotetora, uma vez que estimula a secreção de S100B e esta, em concentrações nanomolares é capaz de induzir efeitos tróficos. Entretanto, se o nível de S100B encontrado em pacientes esquizofrênicos encontra-se elevado, como bem fundamentado pela literatura, acreditamos que o aumento da secreção de S100B não traria benefícios, podendo pelo contrário, piorar os sintomas da doença.

Concluindo, os resultados aqui discutidos corroboram os dados previamente descritos por Neves e colaboradores (2003; 2008; 2010) demonstrando que LASSBio-579 é efetivamente um candidato a antipsicótico atípico, com ação sobre sistemas neurotransmissores considerados importantes na gênese da esquizofrenia e ação de antipsicóticos.

7. CONCLUSÕES

A preparação do sal cloridrato de LASSBio-579 e a sua inserção em β -ciclodextrina não resultaram em produtos ativos no modelo de escalada induzido por apomorfina em camundongos, preditivo de atividade antipsicótica. Assim, aparentemente essa abordagem tecnológica não é adequada para melhoria da atividade e/ou biodisponibilidade de LASSBio-579.

- LASSBio-579 foi efetivo no modelo preditivo de atividade antipsicótica, hiperlocomoção induzida por cetamina em camundongos. Este modelo vem sendo considerado também preditivo de atividade atípica, uma vez que apenas antipsicóticos atípicos são capazes de inibir a atividade hiperlocomotora dos animais em doses que não afetam a locomoção. Este resultado indica uma atividade semelhante à de antipsicóticos atípicos para LASSBio-579.
- Os estudos *in vitro* realizados neste trabalho, demonstraram que LASSBio-579 inibe a captação de glutamato, o que pode ser fundamental quando consideramos a hipótese da hipofunção glutamatérgica da esquizofrenia. Além disso, LASSBio-579 inibiu a secreção da proteína S100B nas fatias hipocâmpais, proteína esta que encontra-se em níveis elevados em pacientes esquizofrênicos e que em concentrações elevadas é responsável por induzir processos apoptóticos.
- Os resultados caracterizam LASSBio-579 como um potencial novo antipsicótico e sugerem que a base livre tenha um perfil farmacocinético mais favorável, em camundongos, ou que a substância seja bastante potente ou, ainda, que a atividade esteja relacionada à presença de metabólitos. Essas questões merecem um estudo futuro mais aprofundado.

Alguns resultados foram omitidos da versão original desta dissertação, uma vez que estes dados se encontram sob sigilo.

8. Referências

Abbot, A. The drug deadlock. **Nature** 468:158-159, 2010.

Aitken, P.G.; Breese, G.R.; Dudek, F.F.; Edwards, F.; Espanol, M.T.; Larkman, P.M.; Lipton, P.; Newman, G.C.; Nowak, T.S.; Panizzon, K.L.; Raley-Susman, K. M.; Reid, K. H.; Rice, M. E.; Sarvey, J. M.; Schoepp, D. D.; Segal, M.; Taylor, C. P.; Teyler, T. J.; Voulalas, P. J. Preparative methods for brain slices: a discussion. **Journal of Neuroscience Methods** 59:139–149, 1995.

Albers, L. J.; Musenga, A.; Raggi, M. A. lloperidone: a new benzisoxazole atypical antipsychotic drug. Is it novel enough to impact the crowded atypical antipsychotic market? **Expert Opinion on Investigational Drugs** 17:61–75, 2008.

Ascher-Svanum, H.; Nyhuis, A.W.; Faries, D.E.; Kinon, B.J.; Baker, R.W.; Shekhar, A. Clinical, Functional, and Economic Ramifications of Early Nonresponse to Antipsychotics in the Naturalistic Treatment of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** 21:1-9, 2007.

Berman, J.A.; Talmage, D.A.; Role, L.W. Cholinergic circuits and signaling in the pathophysiology of schizophrenia. **International Review of Neurobiology** 78:193–223, 2007.

Bressan, R.A.; Erlandsson, K.; Jones, H.M.; Mulligan, R.; Flanagan, R.J.; Ell, P.J.; pilowsky, L.S. Is regionally selective D2/D3 dopamine occupancy sufficient for atypical antipsychotic effect? an in vivo quantitative [123I]epidepride SPET study of amisulpride-treated patients. **American Journal of Psychiatry** 160:1413-1420, 2003.

Buchanan, R.W.; Javitt, D.C.; Marder, S.R.; Schooler, N.R.; Gold, J.M.; McMahon, R.P.; Heresco-Levy, U.; Carpenter, W.T. The cognitive and negative symptoms in schizophrenia trial (CONSIST): the efficacy of glutamatérgico agents for negative symptoms and cognitive impairments. **The American Journal of Psychiatry** 164:1593–1602, 2007.

Budavari, S. **The Merck Index**. 12nd ed. Merck, New Jersey.

Burger, M.E.; Fachineto, R.; Alves, A.; Callegari, L.; Rocha, J.B. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Research** 1031(2):202-10, 2005.

Buttini, S.; Gemma, S.; Campiani, G.; Franceschini, S.; Trotta, F.; Boriello, M.; Ceres, N.; Ros, S.; Coccone, S. S.; Bernetti, M.; Andelis, M.; Brindisi, M.; Nacci, V.; Fiorini, I.; Novellino, E.; Cagnotto, A.; Mennini, T.; Sandager-Nielsen, K.; Andreasen, J. T.; Scheel-Kruger, J.; Mikkelsen, J. D.; Fattorusso, C. Discovery of a new class of potential multifunctional atypical antipsychotic agents targeting dopamine D3 and serotonin 5-HT1a and 5-HT2a receptors: design, synthesis, and effects on behavior. **Journal of Medicinal Chemistry** 52:151-169, 2009.

Buyukuysal, R.L. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. **Neurochemistry International** 47:580–588, 2005.

Carpenter, W.T.; Buchanan, R.W. Lessons to take home from CATIE. **Psychiatric Services** 59(5):523-525, 2008.

Carrier, R.L.; Miller, L.A.; Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release** 123(2):78-99, 2007.

Chen, H.; Tandon, R. First- and second-generation antipsychotics and the concept of “atypicality”: implications for clinical practice. **Psychopharmacology Review** 44:81–88, 2009.

Conti F, Weinberg RJ. Shaping excitation at glutamatergic synapses. **Trends in Neuroscience** 22(10):451-8, 1999.

Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.

Colburn, W.A.; Heath, G. Efficient and Effective Drug Development. In: Krishna, R. **Applications of Pharmacokinetic Principles in Drug Development**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2004. p. 1-20.

Conrado, D.J; Verli, H.; Neves, G.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J.; Rates, S.M.K.; Dalla Costa, T. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N-phenylpiperazine antipsychotic prototype. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60:699-707, 2008.

Costall, B., Naylor, R.J., Nohria, V. Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. **European Journal of Pharmacology** 50:39-50, 1978.

Coyle, J.T.; Tsai, G.; Goff, D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. **Annals of New York Academic of Sciences** 1003:318-27, 2003.

Crilly, J. The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. **History of Psychiatry** 18:39–60, 2007.

Dahan, A., Miller, J. M.; Hoffman, A.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 99:2739–2749, 2010.

Danbolt, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology** 65:1–105, 2001.

Davidson, M.; Galderisi, S.; Weiser, M.; Werbeloff, N.; Fleischhacker, W.W.; Keefe, R.S.; Boter, H.; Keet, I.P.M.; Prelipceanu, D.; Rybakowski, J.K.; Libiger, J.; Hummer, M.; Dollfus, S.; López-Ibor, J.J.; Hranov, L.G.; Gaebel, W.; Peuskens, J.; Lindfors, N.; Riecher-Rössler, A.; Kahn, R.S. Cognitive effects of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: a randomized, open-label clinical trial (EUFEST). **The American Journal of Psychiatry** 166:675–682, 2009.

Elkis, H. e Meltzer, H.Y. Refractory Schizophrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 29 (II): 41-7, 2007.

Fleischhacker, W.W. Aripiprazole. **Expert Opinion on Pharmacotherapy** 6:2091-2101, 2005.

Gamsiz, E.D.; Thombre, A.G.; Ahmed, I.; Carrier, R.L. Drug salts and solubilization: modeling the influence of cyclodextrins on oral absorption. **Annals of Biomedical Engineering** 39(1):455-68, 2011.

Gaspar, P.A.; Bustamante, M.L.; Silva, H.; Aboitiz, F. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **Journal of Neurochemistry** 111:891–900, 2009.

Goldim, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

Gonçalves, D.; Karl, J.; Leite, M.; Rotta, L.; Salbego, C.; Rocha, E.; Wofchuk, S.; Gonçalves, C-A. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. **Neuroreport** 13:1533–1535, 2002.

Graeff, F.G.; Guimarães, F.S; Zuardi, A.W. Medicamentos antipsicóticos. In: Graeff, F.G. e Guimarães, F.S. (Ed.) **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Ateneu, 1999.

Javitt, D.C.; Zukin, S.R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. **The American Journal of Psychiatry** 148:1301–1308, 1991.

Jones, P.B.; Barnes, T.R.; Davies, L.; Dunn, G.; Lloyd, H.; Hayhurst, K.P.; Murray, R.M.; Markwick, A.; Lewis, S.W. Randomized controlled trial of the effect on quality of life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia. **Archives of General Psychiatry** 63:1079–1087, 2006.

Kahn, R.S.; Fleischhacker, W.W.; Boter, H.; Davidson, M.; Vergouwe, Y.; Keet, I.P.; Gheorghe, M.D.; Rybakowski, J.K.; Galderisi, S.; Libiger, J.; Hummer, M.; Dollfus, S.; López-Ibor, J.J.; Hranov, L.G.; Gaebel, W.; Peuskens, J.; Lindefors, N.; Riecher-Rössler, A.; Grobbee, D.E. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomized clinical trial. **Lancet** 371:1085–1097, 2008.

Kapur, S.; Remington, G. Dopamine D2 receptors and their role in antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. **Biological Psychiatry** 50:873–883, 2001.

Kapur, S.; Seeman, P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. **American Journal of Psychiatry** 158:360–369, 2001.

Karam, C.S.; Ballon, J.S.; Bivens, N.M.; Freyberg, Z.; Girgis, R.R.; Lizardi-Ortiz, J.E.; Markx, S.; Lieberman, J.A.; Javitch, J.A. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. **Trends in Pharmacological Sciences** 31:381–390, 2010.

Keefe, R.S.E.; Bilder, R.M.; Davis, S.M.; Harvey, P.D.; Palmer, B.W.; Gold, J.M.; Meltzer, H.Y.; Green, M.F.; Capuano, G.; Stroup, T.S.; McEvoy, J.P.; Swartz, M.S.; Rosenheck, R.A.; Perkins, D.O.; Davis, C.E.; Hsiao, J.K.; Lieberman, J.A. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE trial. **Archives of General Psychiatry** 64:633–647, 2007.

Keshavan, M.S.; Tandon, R.; Boutros, N.N.; Nasrallah, H. Schizophrenia, “just the facts”: What we know in 2008 Part 3: Neurobiology. **Schizophrenia Research** 106:89–107, 2008.

Kulagowski, J.J.; Broughton, H.B.; Curtis, N.R.; Mawer, I.M.; Ridgill, M.P.; Baker, R.; Emms, F.; Freedman, S.B.; Marwood, R.; Patel, S.; Ragan, C.I.; Leeson, P.D. 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor. **Journal of Medicinal Chemistry** 39(10):1941-1942, 1996.

Leite, M.C.; Galland, F.; Brolese, G.; Gonçalves, C.A. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods** 169:93-99, 2008.

Lewis, D.A.; Cho, R.Y.; Carter, C.S.; Eklund, K.; Forster, S.; Kelly, M.A.; Montrose, D. Subunit-selective modulation of GABA type A receptor neurotransmission and cognition in schizophrenia. **The American Journal of Psychiatry** 165:1585–1593, 2008.

Lewis, D.A.; Moghaddam, B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. **Archives of Neurology** 63:1372–1376, 2006.

Lieberman, J.A.; Stroup, T.S.; McEvoy, J.P.; Swartz, M.S.; Rosenheck, R.A.; Perkins, D.O.; Keefe, R.S.; Davis, S.M.; Davis, C.E.; Lebowitz, B.D.; Severe, J.; Hsiao, J.K. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **The New England Journal of Medicine** 353:1209–1233, 2005.

Lisman, J. E.; Grace, A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron** 46:703–713, 2005.

Lisman, J. E.; Otmakhova, N. A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: Elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. **Hippocampus** 11:551–568, 2001.

Luby, E.D., Cohen, B.D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J.S., Kelley, R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. **A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry** 81:363–369, 1959.

Marwaha, S., Johnson, S. Schizophrenia and employment—a review. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology** 39:337–349, 2004.

Matute, C.; Melone, M.; Vallejo-Illarramendi, A.; Conti, F. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. **Glia** 49:451–455, 2005.

Melone, M.; Vitellaro-Zuccarello, L.; Vallejo-Illarramendi, A.; Perez-Samartin A.; Matute, C.; Cozzi, A.; Pellegrini-Giampietro, D.E.; Conti, F. The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. **Molecular Psychiatry** 6:380–386, 2001.

Melone, M.; Bragina, L.; Conti, F. Clozapine-induced reduction of glutamate transport in the frontal cortex is not mediated by GLAST and EAAC1. **Molecular Psychiatry** 8:12–13, 2003.

Meltzer, H.Y.; Li, Z.; Kaneda, Y.; Ichikawa, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 27:1159-1172, 2003.

Menegatti, R.; Cunha, A.C.; Ferreira, V.F.; Perreira, E.F.; El-Nabawi, A.; Eldefrawi, A.T.; Albuquerque, E.X.; Neves, G.; Rates, S.M.; Fraga, C.A.; Barreiro, E.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 11:4807-4813, 2003.

Moghaddam, B.; Adams, B.W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. **Science** 281:1349–1352, 1998.

Mouri, A.; Noda, Y.; Enomoto, T.; Nabeshima, T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. **Neurochemistry International** 51:173–184, 2007.

Nagy, J.I.; Li, W.E. A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. **The European Journal of Neuroscience** 12:4567–4572, 2000.

Neves, G.; Fenner, R.; Heckler, A.P.; Viana, A.F.; Tasso, L.; Menegatti, R.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J.; Dalla-Costa, T.; Rates, S.M.K. Dopaminergic profile of new heterocyclic N-phenylpiperazine derivatives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36:625-629, 2003.

Neves, G.; Kliemann, M.; Betti, A.H.; Conrado, D.J.; Tasso, L.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J.; Dalla Costa, T.; Rates, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the N-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 89:23-30, 2008.

Neves, G.; Menegatti, R.; Antonio, C.B.; Graziottin, L.R.; Vieira, R.O.; Rates, S.M.K.; Noël, F.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A. Searching for multi-target antipsychotics:

Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 18(5):1925-35, 2010.

OECD. **OECD guideline n° 423: Guideline for testing of chemicals. Acute oral toxicity – acute toxic class method**. 2001.

Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry** 83:346–356, 1977

Pilowsky, L.S.; Mulligan, R.S.; Acton, P.D.; Ell, P.J.; Costa, D.C.; Kerwin, R.W. Limbic selectivity of clozapine. **Lancet** 350:490–491, 1997.

Quincozes-Santos, A.; Andreazza, A.C.; Nardin, P.; Funchal, C.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, A. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. **Neurotoxicology** 28:886–891, 2008.

Quincozes-Santos, A.; Bobermin L.D.; Kleinkauf-Rocha, J, Souza, D.O.; Riesgo, R.; Gonçalves, C.A.; Gottfried, A. Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 33:11–15, 2009.

Quincozes-Santos, A.; Bobermin, L.D.; Tonial, R.P.; Bambini-Junior, V.; Riesgo, R.; Gottfried, C. Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience** 260(6):475-81, 2010.

Rao, S.G.; Williams, G.V.; Goldman-Rakic, P.S. Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA_(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory. **The Journal of Neuroscience** 20:485–494, 2000.

Rothermundt, M.; Missler, U.; Arolt, V.; Peters, M.; Leadbeater, J.; Wiesmann, M. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. **Molecular Psychiatry** 6:445-9, 2001.

Rothermundt, M.; Peters, M.; Prehn, J.H. Arolt, V. S100B in brain damage and neuro-degeneration. **Microscopy Research and Technique** 60:614-32, 2003.

Rothermundt, M.; Ponath, G.; Glaser, T.; Hetzel, G.; Arolt, V. S100B serum levels and long term improvement of negative symptoms in patients with schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 29:1004-11, 2004.

Rothstein, J.D.; Marlin, L.; Levey, A.I.; Dykes-Hoberg, M.; Jin, L.; Wu, D.; Nash, N.; Kund, R.W. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron** 13:713–725, 1994.

Sarandol, A.; Kirli, S.; Akkaya, C.; Altin, A.; Demirci, M.; Sarandol, E. Oxidative/antioxidative systems and their relation with serum S100B levels in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 31:1164-9, 2007.

Satow, A.; Suzuki, G.; Maehara, S.; Hikichi, H.; Murai, T.; Murai, T.; Kawagoe-Takaki, H.; Hata, M.; Ito, S.; Ozaki, S.; Kawamoto, H.; Ohta, H. Unique Antipsychotic Activities of the Selective Metabotropic Glutamate Receptor 1 Allosteric Antagonist 2-Cyclopropyl-5-[1-(2-fluoro-3-pyridinyl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 330:179–190, 2009.

Seeman, P.; Corbett, R.; Van Tol, H.H. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. **Neuropsychopharmacology** 16:93-110, 1997.

Shapiro, D. A.; Renock, S.; Arrington, E.; Chiodo, L. A.; Liu, L. X.; Sibley, D. R.; Roth, B. L.; Mailman, R. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. **Neuropsychopharmacology** 28:1400–1411, 2003.

Schroeter, M.L.; Abdul-Khaliq, H.; Krebs, M.; Diefenbacher, A.; Blasig, I.E. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia - original research and meta-analysis. **Psychiatry Research** 167:66-72, 2009.

Schroeter M.L.; Steiner, J. Elevated serum levels of the glial marker protein S100B are not specific for schizophrenia or mood disorders. **Molecular Psychiatry** 14:235-237, 2009.

Sikich, L.; Frazier, J.A.; McClellan, J.; Findling, R.L.; Vitiello, B.; Ritz, L.; Ambler, D.; Puglia, M.; Maloney, A.E.; Michael, E.; De Jong, S.; Slifka, K.; Noyes, N.; Hlastala, S.; Pierson, L.; McNamara, N.K.; Delporto-Bedoya, D.; Anderson, R.; Hamer, R.M.; Lieberman, J.A. Double-blind comparison of first- and second-generation antipsychotics in early-onset schizophrenia and schizo-affective disorder: findings from the treatment of early-onset schizophrenia spectrum disorders (TEOSS) study. **The American Journal of Psychiatry** 165:1420–1431, 2008.

Smith, R.C.; Lindenmayer, J.P.; Davis, J.M.; Cornwell, J.; Noth, K.; Gupta, S.; Sershen, H.; Lajtha, A. Cognitive and antismoking effects of varenicline in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. **Schizophrenia Research** 110:149–155, 2009.

Snyder, E.M.; Murphy, M.R. Schizophrenia therapy: beyond atypical antipsychotics. **Nature Reviews** 7:471 – 472, 2008.

Stahl, Stephen M. **Essential psychopharmacology : neuroscientific basis and practical applications**. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

Stahl, S.M. Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **CNS Spectrums** 12(4):265-268, 2007.

Steiner, J.; Schroeter, M.L.; Schiltz, K.; Bernstein, H.G.; Müller, U.J.; Richter-Landsberg, C.; Müller, W.E.; Walter, M.; Gos, T.; Bogerts, B. Keilhoff, G. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. **Neuroscience** 167(4):1025-31, 2010.

Strange, P.G. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. **Pharmacological Reviews** 53:119-133, 2001.

Swayze, V.W.I. Frontal leucotomy and related psychosurgical procedures in the era before antipsychotics (1935–1954): a historical review. **The American Journal of Psychiatry** 152:505–515, 1995.

Swartz, M.S.; Perkins, D.O.; Stroup, T.S.; Davis, S.M.; Capuano, G.; Rosenheck, R.A.; Reimherr, F.; McGee, M.F.; Keefe, R.S.; McEvoy, J.P.; Hsiao, J.K.; Lieberman, J.A. Effects of antipsychotic medications on psychosocial functioning in patients with chronic schizophrenia: findings from the NIMH CATIE study. **The American Journal of Psychiatry** 164:428–436, 2007.

Tanaka, K.; Watase, K.; Manabe, T.; Yamada, K.; Watanabe, M.; Takahashi, K.; Iwana, H.; Nishikawa, T.; Ichihara, N.; Kikuchi, T.; Okuyama, S.; Kawashima, N.; Hori, S.; Takimoto, M.; Wada, K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science** 276:1699–1702, 1997.

Tandon, R.; Nasrallah, H.A.; Keshavan, M. Schizophrenia, “Just the Facts”: What we know in 2008 Part 1: Overview. **Schizophrenia Research** 100:4–19, 2008.

Tandon, R.; Nasrallah, H.A.; Keshavan, M. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention: past, present, and future. **Schizophrenia Research** 122:1–23, 2010.

Tauscher, J.; Hussain, T.; Agid, O.; Verhoeff, N.P.; Wilson, A.A.; Houle, S.; Remington, G.; Zipursky, R.B.; Kapur, S. Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics. **American Journal of Psychiatry** 161:1620-1625, 2004.

Thomazi, A.P.; Godinho, G.F.; Rodrigues, J.M.; Schwalm, F.D.; Frizzo, M.E.; Moriguchi, E.; Souza, D.O.; Wofchuk, S.T. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. **Mechanisms of Ageing and Development** 125:475–481, 2004.

Tramontina, F.; Leite, M.C.; Gonçalves, D.; Tramontina, A.C.; Souza, D.F.; Frizzo, J.K.; Nardin, P.; Gottfried, C.; Wofchuk, S.T.; Gonçalves, C-A. High Glutamate Decreases S100B Secretion by a Mechanism Dependent on the Glutamate Transporter. **Neurochemistry Research** 31:815–820, 2006.

Tuominen, H. J.; Tiihonen, J.; Wahlbeck, K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. **Schizophrenia Research** 72:225–234, 2005.

Vallejo-Illarramendi, A.; Torres-Ramos, M.; Melone, M.; Conti, F.; Matute, C. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. **Glia** 50:276–279, 2005.

Van Os, J. & Kapur, S. **Schizophrenia** 374:635–645, 2009.

Weber, J.; McCormack, P. L. Asenapine. **CNS Drugs** 23:781–792, 2009.

Wong, A.H.; Van Tol, H.H. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. **Neuroscience Biobehavior Review** 27: 269-306, 2003.

World Health Organization, 2009. W.H.O. Model List of Essential Medicines 16th Edition. Disponível em:

<http://www.who.int/medicines/publication/essentialmedicines/en/index/html>.

Zhang, X.Y.; Xiu, M.H.; Song, C.; Chen, D.C.; Wu, G.Y.; Haile, C.N.; Kosten, T.A.; Kosten, T.R. Increased serum S100B in never-medicated and medicated schizophrenic patients. **Journal of Psychiatric Research** 44:1236-1240, 2010.

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro*pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008244

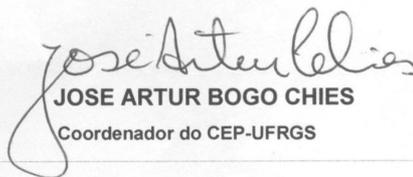
Título : Estudo do efeito dos derivados n-fenilpiperazínicos LASSBio579 e LASSBio664 em modelos animais de esquizofrenia e memória e sobre parâmetros gliais

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
STELA MARIS KUZE RATES	PESQ RESPONSÁVEL	stela.rates@ufrgs.br	33085108
ANDRESA HEEMANN BETTI	PESQUISADOR	ahbetti@gmail.com	
CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED	PESQUISADOR	cgottfried@ufrgs.br	33087754
DIEGO RAFAEL HASSE	PESQUISADOR	dieggorafael@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 63 , ata nº 143 , de 7/1/2010 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 7 de janeiro de 2010


JOSE ARTUR BOGO CHIES
 Coordenador do CEP-UFRGS